This Page Is Inserted by IFW Operations and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents will not correct images, please do not report the images to the Image Problem Mailbox.

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Internationales Baro INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 5:

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:

WO 92/22566

C07K 1/06, 1/04 C07C 271/22

(43) Internationales A1

Veröffentlichungsdatum:

23. Dezember 1992 (23.12.92)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/EP92/01280

(22) Internationales Anmeldedatum:

5. Juni 1992 (05.06.92)

(30) Prioritätsdaten:

P 41 19 544.2

13. Juni 1991 (13.06.91)

DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): GE-SELLSCHAFT FÜR BIOTECHNOLOGISCHE FOR-SCHUNG MBH [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).

(72) Erfinder; and

(75) Erfinder/Ammelder (nur für US): BARTL, Ralf [DE/DE]; FRANK, Ronald [DE/DE]; Mascheroder Weg 1, D-3300 Braunschweig (DE).

(74) Anwalt: BOETERS, Hans, D.; Bereiteranger 15, D-8000 München 90 (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), BE (europäisches Patent), CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), GR (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP. LU (europäisches Patent), MC (europaisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), sches Patent), US.

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Anderungen eintreffen.

(54) Title: PROTECTED AMINO-ACID UNIT, ITS PREPARATION AND ITS USE

(54) Bezeichnung: GESCHÜTZTER AMINOSÄUREBAUSTEIN, HERSTELLUNG UND VERWENDUNG

(57) Abstract

The invention concerns an amino-acid unit for use in peptide synthesis in which a hydrogen atom of the amino group entering into a peptide bond is protected by a temporary amino protection group which can be cleaved under non-acid conditions. It is characterized in that the second hydrogen atom of this amino group is protected by a further protection group which can be introduced by a Mannich reaction. The invention also relates to a method of preparing the said amino-acid unit and to its use in peptide synthesis.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft einen Aminosaurebaustein für die Peptidsynthese, bei dem ein Wasserstoff-Atom der eine Peptidbindung einzugebenden Aminogruppe durch eine temporäre Aminoschutzgruppe geschützt ist, die unter nicht-sauren Bedingungen abgespalten werden kann, dadurch gekennzeichnet, daß das zweite Wasserstoff-Atom dieser Aminogruppe durch eine weitere Schutzgruppe geschützt ist, die durch eine Mannich-Reaktion einführbar ist; die Erfindung betrifft zudem ein Verfahren zur Hertellung des obengenannten Aminosäurebausteins und die Verwendung davon bei der Peptidsynthese.

LEDIGILICH ZUR INFORSIATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfhögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

ΑT	Osterrotch	FI	Finaland	MN	Mongolei
ÂU	Australien	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
	Barbudus	GA	Gahon	MW	Malawi
88		G8	Vereinigtes Köngreich	NL	Niederlande
BE	Belgien		Guinza	NO	Norwegen
BF	Burkina Faso	GN	_	PL	Polen
ВC	Bulgarien	GR	Griechenland	RO	Rumänien
BJ	Benin	HU	Ungara		Russische Föderatum
BR	Brasilian	31	Irland	RU	
CA	Kanada	11	ltalien	SD	Sudan
ĊŒF	Zentrale Afrikanische Republik	16	Japan	SE	Schweden
		KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CG	Kongo	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CH	Schweiz		I nechtenstein	TD	Tschild
CI	Côte d'Ivoire	LI	• • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	TC	Tugo
CM	Kainerun	l.K	Ser Lunka	US	Vereinigte Staaten von Amerika
C)	Tachechoslowakei	LÜ	Luxenburg	03	
DE*	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MC	Mudagoskar		
ES	Source	M	Malı		

Aminosäure

Geschützter Aminosaurebaustein. Herstellung und Verwendung

In der molekularbiologischen und medizinischen Forschung sind chemisch synthetisierte Peptide (Oligo- und Polypeptide) zu einem wichtigen Hilfsmittel geworden. Sie werden eingesetzt zur Herstellung spezifischer Antikörper für Immunaffinitätschromatographie, Identifizierung unbekannter Genprodukte und Entwicklung von Vaccinen gegen Krankheitserreger, als Peptidhormone und deren Analoga mit agonistischer oder antagonistischer Wirkung, als Modellverbindungen in Proteinstrukturuntersuchungen u.v.a.

Diese Peptide sind über Amidbindungen (Peptidbindungen) verknüpfte Oligo- bzw. Polymere (n bis etwa 150) von Aminosäuren.

Im folgenden werden unter Peptiden auch solche verstanden, die außer den 20 natürlichen L-a-Aminosäuren auch Nicht-a-, D- bzw. chemisch modifizierte Aminosäuren (beliebiges R) enthalten. Die chemische Synthese der Peptide erfolgt stufenwelse durch Verknüpfung (Kopplung) geeignet geschützter Aminosäure-, Dioder Oligopeptidbausteine. Verschiedene Syntheseverfahren, die

Peptid

sich in der Art der Schutzgruppen und der Ch mie d r Bindungsknüpfung unterscheiden, gehören zum Stand der Technik. Einen überblick geben:

- R. B. Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85, 2149 (1963)
- E. Wünsch et al. in Houben-Weyl: Methoden der organischen Chemie, 4. Auflage, Band 15 (E. Müller, Herausgeber) Thieme, Stuttgart, 1974;
- G. Barany, R. B. Merrifield, The Peptides, Vol. 2 (E. Gross,
 - J. Meienhofer, Eds) Academic Press, New York, 1979, p. 1

Im Verlauf vieler Synthesen kann es zu problematischen Abschnitten kommen, von denen an die Kopplungsausbeute rapide sinkt. Bei einzelnen Peptiden kann dies bereits nach sehr wenigen Kopplungen eintreten (schwierige Sequenzen). Verantwortlich für dieses Phänomen ist in erster Linie die Faltung der Peptidkette zu β-Faltblattstrukturen durch intra- und intermolekulare Wasserstoffbrücken. Die N-terminalen Aminofunktionen sind dann für eine chemische Reaktion nicht mehr vollständig zugänglich. An der Faltung der Peptide sind die Amidprotonen der Peptidbindung maßgeblich beteiligt. (R. C. de L. Milton, S. C. F. Milton, P. A. Adams, J. Am. Chem. Soc., 112, 6039 (1990).

Bisner sind schon eine Reihe von Versuchen unternommen worden. die Ausbildung der ß-Faltblattstrukturen zu vermeiden. Neben der Variation von Temperatur, Lösungsmittel und geringere Trägerbeladungen wurden auch verschiedene Zusätze wie Salze oder Harnstoff während der Synthese getestet (z. B. F. C. Westall, A. B. Robinson, J. Org. Chem., 35, 2842 (1970) und R. C. de L. Milton et al. 1990, s.o.).

Das wirkungsvollste aber auch schwierigste Konzept zur Vermeidung der Wasserstoffbrücken setzt auf die chemische Modifizierung der Aminosäure mit einer zusätzlichen Schutzgrupe für das zweite N-, insbesondere an-Proton (H. Eckert, C. Seidel, Angew.

Chem., 98, 168 (1986)). Eine wichtige Voraussetzung für die Syntheseeignung ist die Ortogonalität der neuen Schutzgruppe zu den bereits verwendeten. Außerdem sollte sie keinen negativen Einfluß (sterisch oder elektronisch) auf die Aminofunktion haben. Diese Schutzgruppe bleibt dann während der Synthese erhalten und wird erst nach dem Aufbau des vollständigen Peptids abgespalten.

Gemäß einer Ausführungsform wird die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe durch einen Aminosäurebaustein für die Peptidsynthese gelöst, bei dem ein Wasserstoff-Atom der eine Peptidbindung einzugehenden Aminogruppe durch eine temporäre Aminoschutzgruppe geschützt ist, die unter nicht-sauren Bedingungen abgespalten werden kann, wobei dieser Baustein dadurch gekennzeichnet ist.

- (a) daß das zweite Wasserstoff-Atom dieser Aminogruppe durch eine weitere Schutzgruppe geschützt ist, die durch eine Mannich-Reaktion einführbar ist, und
- (b), sofern es sich bei dem Aminosäurebaustein um einen Dipeptidbaustein handelt, auch das Wasserstoff-Atom der Peptidbindung durch eine derartige weitere Schutzgruppe geschützt sein kann, oder
- (c), sofern es sich bei dem Aminosäurebaustein um einen Oligopeptidbaustein handelt, auch ein bis alle Wasserstoff-Atome der Peptidbindungen durch eine derartige weitere Schutzgruppe geschützt sein können.

Bei dem erfindungsgemäßen Aminosäurebaustein kann es sich um einen Baustein für eine einzelne Aminosäure, um einen Dipeptidbaustein oder um einen Oligopeptidbaustein handeln.

Bei der eine Peptidbindung einzugehenden Aminogruppe kann es sich um eine a- oder β -ständige Aminogruppe handeln.

Bei der temporären Aminoschutzgruppe kann s sich um eine Urethangruppe handeln, beispielsweise Fluorenylm th xycarbonyl (Fm c).

Die Carboxylgruppe des Aminosäurebausteins kann frei, ebenfalls geschützt oder aktiviert (Aktivester) vorliegen.

Der erfindungsgemäße Aminosäurebaustein kann durch eine weitere Schutzgruppe (R'''-X-CH2-) gekennzeichnet sein, die unter Verwendung von Formaldehyd und einer H-aziden Verbindung (R'''-X-H; R''': Rest der Mannich-Reaktionskomponente), bei der das azide H-Atom mit einem Heteroatom (X) mit freiem Elektronenpaar verknüpft ist, beispielsweise eines Alkohols (R'''-OH), eines Thioalkohols (R'''-SH) oder eines sekundären Amins (R'''-NR1VH; Riv: weiterer Rest der Mannich-Reaktionskomponente, kein Wasserstoff), mit Hilfe der Mannich-Reaktion einführbar ist.

Gemäß einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung eines Aminosäurebausteins für die Peptidsynthese, das dadurch gekennzeichnet ist, daß man von einem üblichen Aminosäurebaustein ausgent, bei dem ein Wasserstoff-Atom der eine Peptidbindung einzugehenden Aminogruppe durch eine temporäre Aminoschutzgruppe geschützt ist, die unter nicht-sauren Bedingungen abgespalten werden kann, und das andere Wasserstoff-Atom frei ist, und diesen üblichen Aminosäurebaustein einer Mannich-Reaktion unter Verwendung einer H-aziden Verbindung (R'''-X-H), bei der das azide H-Atom mit einem Heteroatom (X) mit freiem Elektronenpaar verknüpft ist, beispielsweise unter Verwendung eines Alkohols, eines Thioalkohols oder eines sekundären Amins, unterwirft.

Die erfindungsgemäßen Aminosäurebausteine lassen sich zur Peptidsynthese, insbesondere zur Peptidsynthese nach Merrifield und beispielsweise nach der Fmoc-tBu-Methode verwenden. Für das erfindungsgemäße Synthesekonzept wurden also Schutzgruppen auf der Basis aminomethylierter Verbindungen der allgemeinen Formel R'''-X-CH2- entwickelt. Darin bedeutet X ein Heter atom mit freiem Elektronenpaar und R''' einen beliebigen Rest der Mannich-Reaktionskomponente. Diese Schutzgruppen können sauer abgespalten werden.

Zur Herstellung des erfindungsgemäßen Aminosäurebausteins kann man von einem üblichen Aminosäurebaustein der folgenden allgemeinen Formel ausgehen:

R-CO-NH-CHR'-COOR''

Die entstehende Aminosäure entspricht dann

mit R-CO: α -Aminoschutzgruppe nach Stand der Technik, die unter nicht sauren Bedingungen abgespalten werden kann; R': Seitenkette der AS; R'': OH, Aktivester oder Schutzgruppe; R'''; Rest der neuen Schutzgruppe; X: O, S, NR^N (R^N \neq H) etc.

Die Einführung der Schutzgruppe durch eine Mannich-Reaktion (z. B. M. Tramontini, L. Angiolini, Tetrahedron, 46, 1791 (1990) (Review)) erfolgt nach dem folgenden Schema:

Prinzipiell läßt sich eine solche Mannich-Reaktion auch mit einem vollgeschützen Di- oder Oligopeptid durchführen. Dabei wird die neue Schutzgruppe sowohl am N-Terminus, als auch an den mittelständigen Peptidbindungen eingeführt. Damit ließe sich ein in den für die Peptidsynthese verwendeten Lösungsmittel unlösliches Oligopeptidfragment in eine lösliche Form überführen. Die Abspaltung erfolg als Rückreaktion.

Im Folgenden wird die Anwendung dieses Konzepts in der Fmoc-Strategie aufgezeigt (G. B. Fields, R. L. Noble, Int. J. Peptide Protein Res., 35, 161 (1990)).

Geschützte Fmoc-Aminosäure

Beispiele für die Variationsvielfalt der Schutzgruppen sind

Fmoc-(Ptm)Gly-OH

Ptm: Phenylthiomethyl-

Fmoc-(Ptm)Ala-OH

Fmoc-(Ptm)Val-OH

Fmoc-(Etm)Ala-OH

Etm: Ethylthiomethyl-

Fmoc-(Etm) Val-OH

Fmoc-(Mom)Gly-OH

Mom: Methyloxymethyl-

Fmoc-(Mom)Ala-OH

Fmoc-(Bom)Val-OH

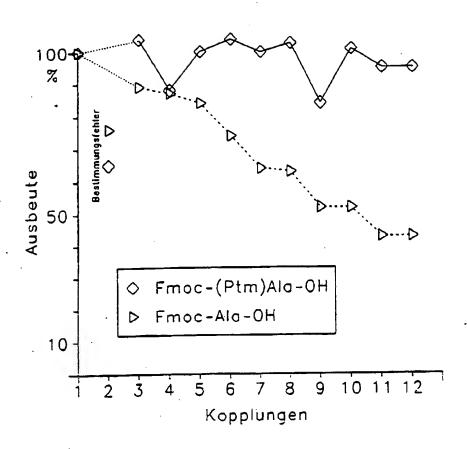
Bom: Benzyloxymethyl-

die als farblose, zähe Öle erhalten werden. Zur vereinfachten linearen Schreibweise wird die zusätzliche αN-Schutzgruppe in runden Klammern vor das Symbol für die Aminosäure gesetzt.

Bei der Einführung der neuen Schutzgruppe fällt die neue Aminosäure als rotationsgehindertes Konformerengemisch der CO-N-Bindung an (Signalverdopplung im NMR-Spektrum), was aber für die Peptidsynthese nicht von Belang ist.

Die Einsetzbarkeit dieser Aminosäurederivate für die Peptidsynthese konnte durch die Darstellung eines vollständig geschützten Tripeptid gezeigt werden. Die Synthese des Fmoc-(Mom)Gly-(Mom)Gly-Val-OBz erfolgte in Lösung.

Für die Untersuchungen der Kopplungsausbeuten im Verlauf der Synthese einer schwierigen Modelsequenz (Ala)₁₃ wurde die Festphasensynthese herangezogen. Für die zweite α -N-Schutzgruppe wurde die Phenylthiomethyl-Gruppe (Ptm) gewählt. Während der Synthese mit konventionellem Fmoc-Ala-OH beobachtet man schneil einen allmählichen Ausbeuteabfall. Bei Verwendung der neuen, geschützten Aminosäure Fmoc-(Ptm)Ala-OH findet man unter gleichen Reaktionsbedingungen keine Ausbeuteverluste.



Methoden

Allgemeine Darstellung der Aminosäuren

1 mmol konventionell geschützte Aminosäure (gegebenfalls als Alkalisalz mit kat. Mengen Citronensäure) werden mit ca. 3-6 fachem Überschuß Paraformaldehyd und ca. 10 fachem Überschuß H-acider Verbindung in einem gasdichten und druckstabilen Reaktionsgefäß eingeschlossen und 2 d bei 90-100 °C gerührt. Die Reinigung erfolgt durch Flüssigkeitschromatographie über C-18 Kieselgelmaterial in säurefreiem Acetonitril/Wassergradienten.

Darstellung von Fmoc-(Mom)Gly-(Mom)Gly-Val-OBz

Fmoc-(Mom)Gly-OLi

Fmoc-Gly-OH wird vorteilhaft als Lithiumsalz für die o. a. Vorschrift eingesetzt. Fmoc-(Mom)Gly-OLi wird nahezu quantitativ erhalten.

<u>MS: $C_{19}H_{19}NO_5$ (341)</u> EI: m/e (%) = 341 (1, M⁺), 30 (2, M⁺-CH₃OH), 266 (<1, 309-CO₂+H⁺), 178 (100, Fluorenyl)

Fmoc-(Mom)Gly-Val-OBz

48,6 μ mol Fmoc-(Mom)Gly-OLi und 50 μ mol HOBt werden in 200 μ l DMF gelöst und mit 48,6 μ mol DIPC 15 min voraktiviert. 121 μ mol H-Val-OBz-HCl und 100 μ mol DMAP werden in 200 μ l DMF gelöst und beide Lösungen Vereinigt. Nach 1 h wird mit etwas Wasser versetzt und die Lösung im Vakuum eingedampit. Trennung durch Flüssigkeitschromatographie mit Acetonitril/Wasser über C-18 Kieselgel ergibt ca. 50 % Dipeptid.

<u>MS: $C_{31}H_{34}N_2O_6$ (530)</u> FAB+: m/e (%) = 553 (1, M⁺+Na), 531 (1, M⁺), 499 (12, M-CH₃O⁻), 277 (10, 499-Fmoc), 179 (Fluorenyl)

H-(Mom)Gly-Val-OBz

Das Fmoc geschützte Dipeptic wird mit ca. 300 µl 20% Piperidin/DMF 20 min behandelt und nach Abziehen des Lösungsmittels im Vakuum w. o. chromatographisch getrennt (quantitativ).

<u>MS: $C_{16}H_{24}N_2O_4$ (308)</u> FAB+: m/e = 277 (9, M-CH₃O⁻), 265 (100, 277-CH₂)

Fmoc-(Mom)Gly-(Mom)Gly-Val-OBz

70 μ mol Fmoc-(Mom)GIy-OLi werden mit 2 eq. HOBt und 1,1 eq. DIPC in 200 μ l DMF 15 min voraktiviert und mit 23 μ mol Dipeptid/200 μ l DMF versetzt. Nach einer Stunde wird mit etwas Wasser versetzt und für die Analytik durch HPLC getrennt.

<u>MS: $C_{35}H_{41}N_3O_8$ (631)</u> FAB+: m/e = 556 (88, M⁺÷2H-Phenyl). 334 (100, 556-Fluorenyl)

Darstellung der Ptm-AS Fmoc-(Ptm)Ala-OH

109,7 mg (0.33 mmol) Fmoc-Ala-OH·H₂O. 50 mg (1.56 mmol) Paraformaldehyd und 400

μl Thiophenol werden wie oben umgesetzt. Chromatographie ergibt 40% Produkt als farbloses, zāhes Öl.

MS: $C_{25}H_{23}NO_4S$ (433) FAB+: m/e = 456 (1, M⁺+Na), 434 (2, M+H⁺), 324 (13, M⁻-Thiophenyl), 179 (100, Fluorenyl)

Die Synthese des (Ala)₁₃ erfolgte auf Cellulose-Disks mit säurelabilem Benzyllinker (R. Frank, R. Döring, Tetrahedron, 44, 6031 (1988)), die bereits mit Fmoc-Ala-OH beladen waren. Die Kopplung der übrigen AS erfolgte in 20 mM Aminosäurelösung mit ca. 4-fachem Überschuß zur Filterbeladung in DMF.

Je 1 eq. der entsprechenden Aminosäure wurde mit 1,5 eq. HOBt und 1,2 eq. DIPC 15 min voraktiviert und auf die mit 10 μ l Bromphenolbiaulsg. (1 mg/1 ml DMF) angefärbten Filter gegeben. Nach einer Stunde Schwenken der Filter in der Reaktionslsg. wurden die noch gefärbten Filter mit je DMF, CH_2Cl_2 , DMF je dreimal gewaschen und erneut eine Stunde mit Aminosäurelsg. behandelt. Noch gefärbte Filter wurden nach erneutem Waschen mit 30 μ l Ac₂O/DIPEA (1:1) in 100 μ l DMF acetyliert. Anschließend wurden mit je 300 μ l 20% Piperidin/DMF die Fmoc-Schutzgruppen gespalten. Zur Bestimmung der Kopplungsausbeuten wurde das Dibenzofluven-Piperidin in CH_2Cl_2 UV-Vermessen ($\epsilon_{301~nm}=8550$).

Die abschließende Abspaltung des Peptids erfolgte mit 95% TFA. 3% Cystein, 2% H₂O. Das lyophilisierte Produkt wurde dann durch HPLC getrennt und durch FAB-MS nachgewiesen.

Abkürzungverzeichnis

Ac₂O Essigsäureanhydrid

Bom Benzyloxymethyl

DIPEA Diisopropylethylamin

DMAP Dimethylaminopyridin

DMF Dimethylformamid

DIPC Diisopropylcarbodiimid

El Elektronenstoß-Ionisation

Etm Ethylthiomethyl

FAB+ Fast Atom Bombardment, positive Ionen

Fmoc 9-Fluorenylmethoxycarbonyl

HOBt Hydroxybenzotriazol

HPLC High Performance Liquid Chromatography

MS Massenspektroskopie

Mom Methyloxymethyl

NMR Nuaciear Magnetic Resonance

Ptm Phenylthiomethyl

TFA Trifluoressigsäure

UV Ultraviolett-Spektroskopie

Fmoc-(Mom)Gly-OH

H-NMR (300 MHz, CDCL)

δ (ppm)	Aufspaltung	g J (Hz)	Integral	Position
7,76 7,59 7,40 7,31 4,82/4,59 4,55/4,39 4,25 4,04/3,98 3,23/3,01	'd' 'd' 't' 't' s · 2 d · 2 dt s · 2 s · 2	-7 -6 -7 -6 6,0/7,0 -6,5/6,5	2 H } 2 H } 2 H } 2 H 2 H 2 H 2 H 1 H 2 H 3 H	9-H, 12-H 15-H, 18-H 10-H, 11-H 16-H, 17-H 3-H 6-H 7-H 2-H

¹³C-NMR (75 MHz. CDCl₃)

δ (ppm)	Aufspaltung	Position
171,21/171,10	s · 2	C-1
156,09/155,71	s · 2	C-5
143,70	S	C-8, C-13
141.23/141,11	s-2	C-14, C-19
127,70	d)	
127,10	d {	C-9 - C-12
125,06/124,75	d⋅2 {	C-15 - C-18
119,90	d }	
79 ,44/78 ,91	t-2	C-3
67,90/67.30	t-2	C-2
55,75/55,15	q·2	C-7
	•	C-4
46,79/46,56	t-2	C-6
141.23/141,11 127,70 127,10 125,06/124,75 119,90 79,44/78,91 67,90/67,30 55,75/55,15 47,07	s·2 d d d d·2 d t·2 t·2 q·2 q	C-14, C-1 C-9 - C-1 C-15 - C- C-3 C-2 C-7 C-4

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, dt = Dublett von Tripletts, '' = mit Feinaußpaltung

Patentansprüche

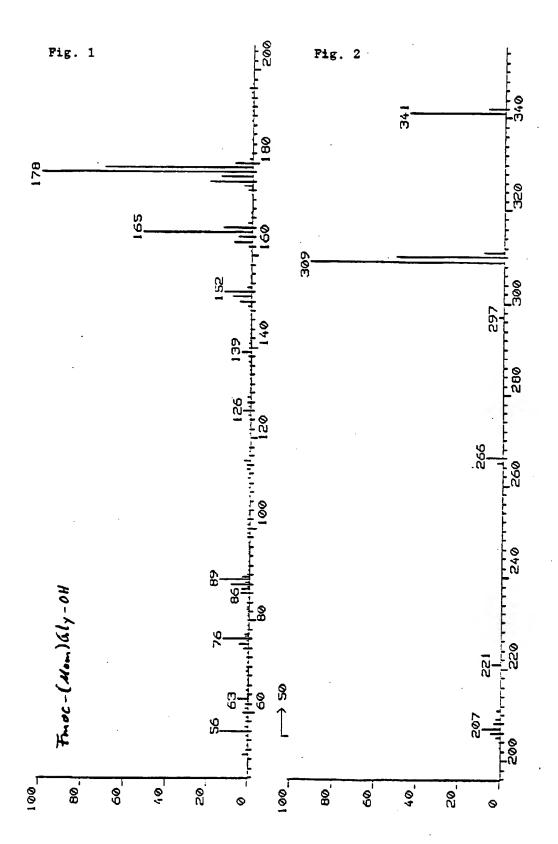
- Aminosäurebaustein für die Peptidsynthese, bei dem ein Wasserstoff-Atom der eine Peptidbindung einzugehenden Aminogruppe durch eine temporäre Aminoschutzgruppe geschützt ist, die unter nicht-sauren Bedingungen abgespalten werden kann, dadurch gekennzeichnet,
 - (a) daß das zweite Wasserstoff-Atom dieser Aminogruppe durch eine weitere Schutzgrupe geschützt ist, die durch eine Mannich-Reaktion einführbar ist, und
 - (b), sofern es sich bei dem Amincsäurebaustein um einen Dipeptidbaustein handelt, auch das Wasserstoffatom der Peptidbindung durch eine derartige weitere Schutzgruppe geschützt sein kann, oder
 - (c), sofern es sich bei dem Aminosäurebaustein um einen Oligopeptidbaustein handelt, auch ein bis alle Wasserstoffatome der Peptidbindungen durch eine derartige weitere Schutzgruppe geschützt sein können.
- 2. Aminosäurebaustein nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei dem Aminosäurebaustein um einen Baustein für eine einzelne Aminosäure, um einen Dipeptidbaustein oder um einen Oligopeptidbaustein handelt.
- 3. Aminosäurebaustein nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der eine Peptidbindung einzugehen-

den Aminogruppe um eine alpha- oder beta-standige Aminogruppe handelt.

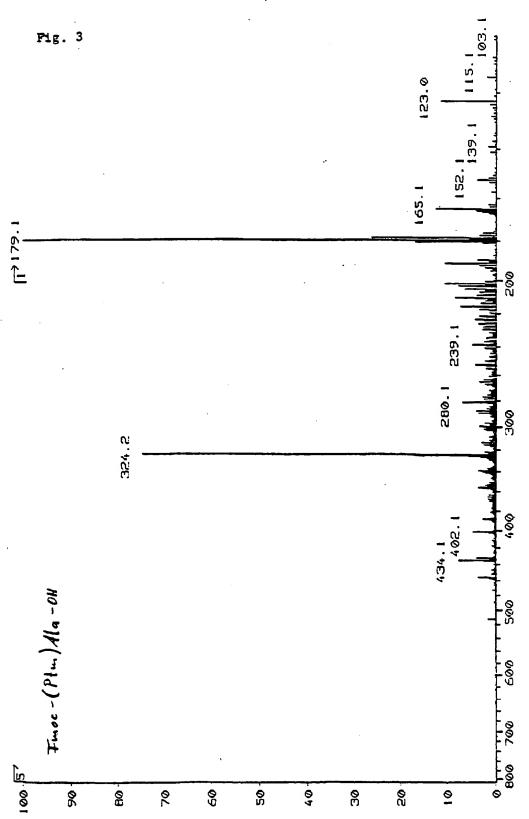
- 4. Aminosaurebaustein nach einem der vorhergehenden Ansprüche.
 dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der temporären Aminoschutzgruppe um eine Urethangruppe handelt, beispielsweise Fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc).
- 5. Aminosaurebaustein nach einem der vornergehenden Anspruche. dadurch gekennzeichnet, daß die Carboxylgruppe des Aminosäurebausteins frei, ebenfalls geschützt oder aktiviert (Aktivester) vorliegt.
- 6. Aminosäurebaustein nach einem der vornergehenden Anspruche, gekennzeichnet durch eine weitere Schutzgruppe (R'''-\lambda-CH2-;, die unter Verwendung von Formaldehyd und einer H-aziden Verbindung (R'''-X-H; R'''; Rest der Mannich-Reaktionskomponente), bei der das azide H-Atom mit einem Heteroatom (X) mit freiem Elektronenpaar verknüpft ist, beispielsweise eines Alkohols (R'''-OH), eines Thioalkohols (R'''-SH) oder eines sekundären Amins (R'''-NR¹VH; R¹V; weiterer Rest der Mannich-Reaktionskomponente, kein Wasserstoff), mit Hilfe der Mannich-nich-Reaktion einführbar ist.
- 7. Verfahren zur Herstellung eines Aminosaurebausteins für die Peptidsynthese, dadurch gekennzeichnet, daß man von einem üblichen Aminosaurebaustein ausgeht, bei dem ein Wasserstoff-Atom der eine Peptidbindung einzugenenden Aminogruppe durch eine temporäre Aminoschutzgruppe geschützt ist, die unter nicht-sauren Bedingungen abgespalten werden kann, und das andere Wasserstoff-Atom frei ist, und diesen üblichen Aminosaurebaustein einer Mannich-Reaktion unter Verwendung einer Haziden Verbindung (R'''-X-H), bei der das azide H-Atom mit einem Heteroatom (X) mit freiem Elektronenpaar verknupft ist.

beispielsweise unter V rwendung eines Alkohols, eines Thioalkoh ls oder eines sekundären Amins, unterwirft.

- 8. V rwendung eines Aminosäurebausteins gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Peptidsynthese.
- 9. Verwendung nach Anspruch 8 bei der Peptidsynthese nach Merrifield.
- 10. Verwendung nach Anspruch 9 bei der Peptidsynthese nach Merrifield gemäß der Fmoc-tBu-Methode.



2/2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/01280

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER					
Int.Cl ⁵ : C 07 K 1/06; C 07 K 1/04; C 07 C 271/22					
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC					
	S SEARCHED				
	umentation searched (classification system followed by	y classification symbols)			
Int.Cl.					
Documentation	n searched other than minimum documentation to the	extent that such documents are included in th	e fields searched		
Electronic data	base consulted during the international search (name	of data base and, where practicable, search to	erms used)		
C. DOCUM	ENTS CONSIDERED TO BE RELEVANI				
Category*	Citation of document, with indication, where a	ppropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Х	TETRAHEDRON LETTERS.		ı		
	vol. 22, No: 34, 1981, OXFORD G	В	•		
	pages 3249 - 3252; T SHONO ET AL.: 'a new carbon-p	hosphorus bond forming			
	reaction and synthesis of amino	alkylphosphonic acid	•		
	derivatives', see table II, com	pound 11			
x	TETRAHEDRON LETTERS.		1		
	No: 9, 1977, OXFORD GB				
	pages 749 - 750; D H RICH AND J P TAM: 'a metho	d for introducing			
	secondary amide bonds into stra	ined cyclic peptides'			
	see the whole document, in part	icular compound No: 6			
x	CHEMISTRY LETTERS. No: 8, Augus	t 1981, TOKYO JP	1		
	pages 1121 - 1124; T SHONO ET A				
	of alpha - aminoalkylfurans and facile synthesis of pyridoxine				
	see the whole document, in part				
	I was a state of the continuous of the continuou				
Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.					
 Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 					
"E" earlier doc	nument but published on or after the international filing date	COMPRESED TOACH OF CAMIDI DE COMPLO	ered to involve an inventive		
cited to e	"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is step when the document is taken alone cited to establish the publication date of another citation or other				
special reason (as specified) "V" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "Exhibition or other more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art					
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "&" document member of the same patent family					
Date of the actual completion of the international search Date of mailing of the international search report					
11 September 1991 (11.09.92) 14 October 1992 (14.10.92)					
Name and mailing address of the ISA/ Authorized officer					
European Patent Office					
Facsimile No.	·	Telephone No.			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/01280

egory*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
	compound 11	
x	CHEMISTRY LETTERS. No: 11, November 1989, TOKYO JP	1
	pages 1963 - 1966; The service Fr Al.: 'a new facile method for construction	`
	of beta-arylpyrrolidine rings and its application to synthesis of racemic mesembrine	
	see compound 8 on page 1965	
A	CH, A, 516 523 (SOGESPAR) 15 December 1971 see the whole document	1–10
·P,X	PEPTIDES: CHEMISTRY AND BIOLOGY (J A SMITH AND J E RIVIER, EDS). PROCEEDINGS OF THE XII AMERICAN PEPTIDE SYMPOSIUM, CAMBRIDGE, JUNE 16-21, 1991 ESCOM, LEIDEN	1-10
	Pages 505 - 506; R BARTL ET AL.: 'towards elimination of segmenzt insolubility during SPPS' see the whole document	,
	see the whole document	
	•	
}		
.		i .

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. EP 92013

9201280 60417

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on The European Patent office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information. 11/09/92

Putent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
CH-A-516523	15-12-71	None	
	•		
		• •	
·			
	•	·	
		,	
,			

Por more details about this annex : see Official Journal of the European Patent Office, No. 12/82

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeiche

PCT/EP 92/01280

			eren Klassifikationssymbolen sind alle anzugebe	p) ⁶
		dassifikation (IPC) oder mach der nationa		
Int.KI.	. 5 CO7K1/06	; C07K1/04;	C07C271/22	
	•			
II. RECHE	RCHIERTE SACHGE	BIETE		
		Recherchierte	r Mindestpriifstoff 7	
Klassifika	tionssytem	l l	Klassifikationssymbole	
Int.Kl.	. 5	CO7K ; CO7C		
				•
			f gehörende Veröffentlichungen, soweit diese orten Sachgehiete fallen ⁸	•
				
III FINECI	HLAGIGE VEROFFE	NTI ICHI NCEN 9		
Art.º		Veröffentlichung !! , soweit erforderlich :	unter Anacha des mallochliches Tella 12	Betr. Anspruch Nr. D
Arc.	Prouverconnus des	Verbitenticating 1 sowere enoughtines	notes. Andabe des themdentimen term	Bar. Albertes (11.
x l	TETOAUCI	DRON LETTERS.	· .	1
^		Nr. 34, 1981, OXFORD	GR	•
		3249 - 3252;	GD .	
.		ET AL.: 'a new carbon	-phosphorus bond	 •
		reaction and synthesi		
	aminoal	kylphosphonic acid der	·ivatives'	
	stehe Ta	abelle II, Verbindung	11	
	TETOAIIE	DRON LETTERS.	•	1
X		1		
		1977, OXFORD GB 749 - 750;		
		H AND J P TAM: 'a meth	od for introducing	
	seconda	ry amide bonds into st		
-	peptide			
		as ganze Dokument, ins	besondere	•
j	Verbind	ung nr. 6		
			,	
			-/	
		gegebenen Veröffentlichungen 10 :	FTF Sallean Vaulifientlichung die nach der	- internationales As-
A Ver	iniert, aber nicht als be	allgemeinen Stand der Technik esonders bedeutsam anzusehen ist	"T" Spätere Veröffentlichung, die nach der meideintum oder dem Prioritätsdamm	veröffentlicht worden
E lite	res Dokument, das jed valen Anmeldedatura vi	och erst zze oder nach dem interna- eröffentlicht worden ist	ist und mit der Anmeldung nicht kollie Verständnis des der Erfindung zugrun	leliegensen Prinzips
"L" Ver	offentlichung, die geei	gnet ist, einen Prioritätsanspruch	oter der ihr zugrundeliegenden Theori "X" Veröffendichung von besonderer Beder	
fest	lichungstatum einer a	lassen, oder durch die das Veröf- oderen im Recherchenbericht ge-	te Erfindung kann nicht als ben oder a keit beruhend betrachtet werden	uf erfinderischer Tätig-
nan and	nten Veröffentlichung eren besonderen Grund	belegt werden soll oder die zus einem I angegeben ist (wie ausgeführt)	"Y" Vertiffentlichung von beson ierer Bedeu	
		auf eine mündliche Offenbarung	te Erfindung kann nicht als auf erfinde ruhend betrachtet werden, wenn die Ve	röffentiich wag mit
	isp; s Resilentiff our var	stellung oder andere Maßnahmea	einer oder menreren underen Veröffent gorie in Verbindung gebracht wird und	lichungen dieser Kate- diese Verbindung für
		dem internationales Anmeldeda- pruchtes Prioritätsdatum veröffest-	cinen Fachmann mahellegend lit	
	n worden ist	•	"A" Verbffentlichung, die Mitgiled derselbe	e r étatinamene Dr
V. BESCH	EINIGUNG		·	
	bschlusses der interna	tionalen Recherche	Absenderatum der internationalen Rech	echenberichts
		(BER 1992	16 4. 10 12	
	II. SEFIE	10ER 1336	10. 1/2.	
otematicaa	e Recherchenbehörde		Unterschrift des bevollmächtigten Belie	bsteten
	EUROPAI	SCHES PATENTAMT	p. masturzo	

Art °	LAGIGE VEROFFENTLICHUNGEN (Fortsettung von Blatt 3) Kennzeichung der Verüffendlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
AR	School State of the State of th	
	•	
(CHEMISTRY LETTERS.	1
`	Nr. 8, August 1981, TOKYO JP	
	Seiten 1121 - 1124:	
	T SHOND FT Al.: 'one step synthesis of	
	alpha-aminoalkylfurans and its application to a	
1	facile synthesis of pyridoxine (vitamine b6)	
1	siehe das ganze Dokument, insbesondere Tabelle	
1	II, Verbindung 11	
x	CHEMISTRY LETTERS.	1
^	Nr. 11, November 1989, TOKYO JP	
1	Saiten 1963 - 1966:	
1	T SHOWN FT AL.: 'a new facile method for	
1	construction of beta-arylpyrrolidine rings and	
.	its application to synthesis of racemic	
1.	mesembrine'	
I	siehe Verbindung 8 auf Seite 1965	
	CH,A,516 523 (SOGESPAR) 15. Dezember 1971	1-10
A	siehe das ganze Dokument	
		1-10
P,X	PEPTIDES: CHEMISTRY AND BIOLOGY (J A SMITH AND J	1-10
1	E DIVIED FOS) PROCEEDINGS OF THE XII AMERICAN	
]	PEPTIDE SYMPOSIUM, CAMBRIDGE, JUNE 16-21, 1991	
	ESCOM, LEIDEN	Í
	Seiten 505 - 506; R BARTL ET AL.: 'towards elimination of segmenzt	
	insolubility during SPPS'	•
	siehe das ganze Dokument	
}	37606 469 30000 000000	
	 . ·	
İ		
.		}
ŀ		
	•	
j		
ļ		
1		
ł		
ŀ	·	
J		
1		

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

EP 9201280 SA 60417

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenhericht angeführten Patentdokumente ungegeben.

Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am Diese Angaben diesen nur zur Unterzichtung und erfolgen ohne Gewähr.

11/09/92

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Datum der Mitglied(er) der Veröffentlichung Patentfamilie	
CH-A-516523	15-12-71	Keine	
	·		
		•	

TO:

LOREN POTEAT STEIN

FAX:

912024964444

PAGES:

27

PRIORITY:

Urgent

SUBMITTED:

07/22/96 11:19:08

FROM:

Josh Groves

Dialog Information Services, Inc.

3460 Hillview Ave. Palo Alto, CA 94304

FAX:

415-858-7069

TEL:

415-858-4293

SUBJECT:

Order RD277 for user 226969 007754-0052999



For questions regarding this fax, please contact Customer Services at 800-3-DIALOG. Please have your DIALOG user number and order number available.

TIME CRITICAL DATA - PLEASE DELIVER IMMEDIATELY

Attention:

LOREN POTEAT STEIN

. Fax Number:

12024964444

Note:

Source:

KR SourceOne: EPO Patent Images

Subaccount:

007754-0052999

Subject:

Order Date:

96/07/22

Order Time:

13:16:31

Estimated Cost*:

\$12.00

Number of Pages:

Order Number:

RD277

User Number:

226969

Copyrighted material reproduced with permission of copyright owner and further reproduction is prohibited or otherwise subject to restriction. Patents are not copyrighted and may be freely reproduced.

*Charges listed are for informational purposes only. Does not include applicable tax or other telecom charges.